螺旋粉虱成虫体内细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rRNA 文库序列分析

王甸洪[1]，吴伟坚[1,*]，符悦冠[1,2]

（1. 华南农业大学昆虫生态研究室，广州 510642；2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所，海南儋州 571737）

摘要：为了解螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* 体内细菌多样性和主要优势菌群结构，用 PCR-DGGE 和 16S rRNA 文库对采自于海南省番石榴上螺旋粉虱雌、雄成虫体内的细菌群落进行了分析。用 PCR 扩增体内细菌 16S rRNA 基因，构建雌、雄虫克隆文库；再用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism，RFLP)方法从文库中筛选不同 16S rRNA 基因图谱，根据图谱对克隆子进行分型。从螺旋粉虱雌、雄两个样品中共获得 10 种分类操作单元(operational taxonomic unit，OTUs)。以 16S rRNA 基因为基础构建系统发育树，系统发育分析表明，螺旋粉虱雌、雄成虫体内优势菌群主要为发酵菌属 *Zymobacter*，杀雄菌属 *Arsenophonus*，泛菌属 *Pantoea* 和假单胞菌属 *Pseudomonas*。*Candidatus* Portiera aleyrodidarum 和 *Arsenophonus* sp. 可能为其体内共生菌群，在所有样品中均可稳定地检测到。这些微生物可能对螺旋粉虱生长发育、繁殖和性比调控起到重要的协同作用。

关键词：螺旋粉虱；总基因组 DNA；16S rRNA 文库；PCR-DGEE；系统发育；操作单元

中图分类号：Q968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)07-0772-10

Bacterial community in *Aleurodicus dispersus* (Hemiptera: Aleyrodidae) estimated by PCR-DGGE and 16S rRNA gene library analysis

WANG Dian-Hong[1], WU Wei-Jian[1,*], FU Yue-Guan[1,2] (1. Laboratory of Insect Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: To understand the bacterial diversity and the dominant types of bacteria in the spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell, bacterial communities present in both sexes of *A. dispersus* collected from *Psidium guajava* in Hainan were characterized using 16S rDNA-polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and 16S rRNA gene clone libraries. The partial bacterial 16S rRNA gene fragment was amplified with PCR, and the clone libraries were constructed. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was performed by digestion of the 16S rRNA gene, and each unique restriction fragment polymorphism pattern was designated as an operational taxonomic unit (OTU). A total of 10 OTUs were identified from samples of both sexes of *A. dispersus*. Phylogenetic trees of bacterial 16S rRNA nucleotide sequences were constructed. Phylogenetic analysis revealed that *Zymobacter*, *Arsenophonus*, *Pantoea*, and *Pseudomonas* are the most dominant groups in both male and female adults of *A. dispersus*. *Candidatus* Portiera aleyrodidarum and *Arsenophonus* sp., possibly the endosymbionts of *A. dispersus*, were detected in all samples. These bacteria may play synergetic roles in development, reproduction and sex-ratio control of the whitefly.

Key words: *Aleurodicus dispersus*; genomic DNA; 16S rRNA gene library; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE); phylogenetic analysis; operational taxonomic unit (OTU)

螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* Russell，属半翅目(Hemiptera)粉虱科(Aleyrodidae)复孔粉虱属 *Aleurodicus*，取食多种热带和亚热带植物，主要通过刺吸植物叶片危害，同时还能分泌大量蜜露诱发煤

基金项目：公益性行业(农业)科研专项 (201103026-4，200803023-02)；科技部国际合作项目(2011DFB30040)

作者简介：王甸洪，男，1980 年生，四川内江人，硕士研究生，从事昆虫生态学研究，E-mail：wdhmyx2007@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: weijwu@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2012-03-21；接受日期 Accepted: 2012-06-26

烟病对寄主造成危害。1905 年，在西印度群岛的马提尼克岛(Martinique)的番石榴 *Psidium guajava* L. 上首次被记录(Russell, 1965)。螺旋粉虱原产于中美洲和加勒比地区，目前已入侵到美洲、欧洲、亚洲、非洲和大洋洲的多个国家和地区(徐岩, 1999)，并给当地的经济造成严重的损失。我国于 1988 年在台湾高雄市大寮乡番石榴上首次发现螺旋粉虱；2006 年 4 月，在海南陵水也首次发现该虫入侵，现也已传遍海南全岛(虞国跃等, 2007)。根据螺旋粉虱在亚洲的分布区及其扩散传播特性，推测极有可能入侵到广东、广西、福建等中国南方多个内陆省份(沈文君和万方浩, 2007)。目前已知该虫在澳大利亚的寄主植物多达 41 科 104 种(Lambkin, 1999)。

昆虫体内含有众多微生物群体，在经历了漫长的协同演化后，其中一些群体与昆虫形成了互惠共生关系(Hertig and Wolbace, 1924; Buchner, 1965; Douglas, 1998)。内共生菌可为宿主昆虫提供多种营养物质(Douglas, 1998)，参与代谢调控(Wilkinson and Douglas, 1996; Shigenobu *et al*., 2000)和影响生殖(Yen and Barr, 1971; Zchori-Fein *et al*., 2001)等；宿主昆虫则可为内共生菌提供稳定的生存环境和营养来源。近年来，国内外对半翅目昆虫体内共生菌的研究开展较多，特别是对刺吸植物汁液的蚜科、粉虱科等刺吸式昆虫的研究较为深入(Baumann, 2005)。目前，对螺旋粉虱体内共生菌的系统性研究还较少，仅见 *Candidatus* Portiera aleyrodidarum (Thao *et al*., 2004a) 和 *Arsenophonus* sp. (Thao *et al*., 2004b)等少数几种内共生菌。

随着分子生物学、宏基因组学等新兴学科逐步运用到环境微生物的生态研究中，使得对环境微生物的研究更加容易和深入。Woese 和 Fox(1977)开始采用寡核苷酸编目法对生物进行分类，认为 16S rRNA 及其类似的 rRNA 基因序列作为生物系统发育指标最为合适；而后以 16S rRNA 为基础鉴定细菌种类的分子生物学技术逐渐成为普遍接受的方法(Clarridge, 2004)。

本研究基于 16S rRNA 基因，建立螺旋粉虱体内微生物 16S rRNA 文库，用 PCR 与限制性内切酶长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)相结合，筛选螺旋粉虱雌、雄成虫体内不同的基因型细菌菌株；同时，还利用 PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis)分析螺旋粉虱雌、雄成虫体内细菌群落多样性，为研究螺旋粉虱体内微生物的群体结构，以及今后综合防控该入侵害虫打下基础。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　试虫及处理：螺旋粉虱雌、雄成虫均于 2010 年 6 月采自于海南省陵水县光坡镇的番石榴 *Psidium guajava* L. 上，采回后立即放于 -20℃ 冰箱中冷冻处理 10 min。螺旋粉虱雌、雄成虫各取 50 头用 ddH_2O 快速洗涤 3 次，收集最后一次洗涤的水作为对照。

1.1.2　其他材料试剂：组织基因组 DNA 提取试剂盒，PCR 扩增试剂和 *Escherichia coli* JM109 均购自北京全式金公司，质粒 pMD18-T 和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。基因组扩增引物和载体扩增引物均由上海生工合成。

1.2　螺旋粉虱体内微生物总基因组 DNA 的提取

DNA 的提取方法参照袁志辉等(2006)，并做适当改进。用液氮研磨和溶菌酶处理，再加入 65℃ 预热的 CTAB 裂解液(100 g/L CTAB, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, pH 8.0)匀浆，然后剧烈震荡 5 s；65℃ 水浴 1 h，期间每 20 min 颠倒混匀一次，水浴后室温放置 5 min；用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, v/v)、氯仿:异戊醇(24:1, v/v)依次抽提一次；取上清液于新的 1.5 mL 离心管中，加 1/10 体积 3 mol/L 的 NaA_C 和 2.5 倍体积的冷无水乙醇，置于 -20℃ 中冷冻 30 min 沉淀 DNA，12 000 r/min 离心 10 min 后，弃上清液；75% 的乙醇洗涤 2 次后，倒置晾干乙醇；加 30 μL 无菌 ddH_2O 在 4℃ 溶解 DNA，-20℃ 保存。

1.3　16S rRNA 基因和 V3 区的扩增

1.3.1　16S rRNA 基因的 PCR 扩增：将所获得的螺旋粉虱体内微生物总基因组 DNA 作为模板，用肠道细菌通用引物(Weisburg *et al*., 1991)：27f(5′-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3′) 和 1492r (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)。扩增反应体系(50 μL)：2.5 U TransStart Taq DNA Polymerase, 4 μL 0.2 mmol/L dNTPs, 5 μL 10×TransStart Taq buffer, 20 μmol/L 引物 27f 和 1492r 各 1 μL, 2 μL 细菌模板总 DNA。反应条件：95℃ 10 min；94℃ 1 min, 55℃ 40 s, 72℃ 2 min, 30 个循环；72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后，用 AxyPrep DNA 凝胶纯化试剂盒回收目的 DNA，操作方法按使用说明进行。

表 1　螺旋粉虱雌、雄成虫 16S rRNA 文库的 PCR-RFLP 筛选结果

Table 1　The screening result of PCR-RFLP from 16S rRNA clone library isolated from female and male adults of the spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*

分类操作单元 OTU	雄虫 Male		雌虫 Female	
	克隆数 Clone number	所占比例(%) Proportion	克隆数 Clone number	所占比例(%) Proportion
MC4BH1	78	39.0	81	40.5
MBE3	45	22.5	47	23.5
MAC3	12	6.0	31	15.5
MAB4	25	12.5	14	7.0
MS3C11	4	2.0	–	–
MAH11	7	3.5	–	–
MS3F4	1	0.5	–	–
MS3G12	1	0.5	–	–
MS3H11	2	1.0	–	–
FSBA8	–	–	1	0.5

–：文库中不含有的分类操作单元 Without the operational taxonomic unit (OTU) in the library.

2.2.2　RDP classifier 分类结果：10 条序列经 RDP classifier 分类后，可归于 10 个真细菌(Eubacterium)属(表 2)，包括柠檬酸杆菌属 *Citrobacter*、泛菌属 *Pantoea*、欧文氏菌属 *Erwinia*、杀雄菌属 *Arsenophonus*、发酵菌属 *Zymobacter*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、微小杆菌属 *Exiguobacterium*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、根瘤菌属 *Rhizobium*。

2.2.3　序列比对与系统发育分析：用 BLAST 与 GenBank 数据库比对的结果见表 2；据此比对结果，用邻近相接法(N-J 法)的 Jukes-Cantor 模型直接构建螺旋粉虱体内细菌菌群的系统发育进化树，结果见图 2。8 条 16S rRNA 序列归为变形菌门(Proteobacteria)，其中 7 条属 γ-proteobacteria，归属为柠檬酸杆菌属 *Citrobacter*、泛菌属 *Pantoea*、杀雄菌属 *Arsenophonus*、发酵菌属 *Zymobacter*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、不动杆菌属 *Acinetobacter* 中；属 α-proteobacteria 的仅 1 条序列，与根瘤菌属 *Rhizobium* 具有较高的同源性，并且在雌、雄成虫文库中的检出比例占挑取阳性克隆数的 90% 以上，可见变形菌门为螺旋粉虱体内优势菌群。另外 2 条序列与厚壁菌门(Firmicutes)的微小杆菌属 *Exiguobacterium* 和类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* 有较高的同源性；从系统发育进化树可见，MC4BH1 与 MBE3 分别与螺旋粉虱内共生菌 *Candidatus* Portiera aleyrodidarum 和 *Arsenophonus* sp. 具有较高的同源性(Thao *et al.*, 2004a, 2004b)。

在 RDP classifier 分类和构建系统发育进化树两种分析方法，虽均可将该 10 种 OTU 划为 10 种系统发育型细菌(phlylotype)(表 2 和图 2)，但结果略有不同：MS3F4 在 RDP classifier 分类结果为欧文氏菌属 *Erwinia*，而系统进化分析结果中则与泛菌属 *Pantoea* 有高度的同源性。

2.3　螺旋粉虱体内细菌多样性的 PCR-DGGE 分析

2.3.1　PCR-DGGE 图谱分析：对螺旋粉虱雌、雄成虫体内细菌的 16S rRNA V3 区序列的 DGGE 图谱(图 3)分析表明：雄成虫中不含有 D114 条带，既雌、雄成虫体内的细菌 DGGE 图谱有差异(表 3)。

2.3.2　序列比对与系统发育分析：将 DGGE 分离获得条带序列结果与 GenBank 数据库比对，结果如表 4，用邻近相接法(N-J 法)的 Jukes-Cantor 模型直接构建螺旋粉虱体内细菌菌群的系统进化树，结果见图 4；数据显示所分离获得的螺旋粉虱体内细菌主要属于变形菌门(Proteobacteria)，雌、雄成虫优势菌群属于泛菌属 *Pantoea*、杀雄菌属 *Arsenophonus*、发酵菌属 *Zymobacter*、假单胞菌属 *Pseudomonas*，与 16S rRNA 文库结果基本相同(表 4)。另外，D5-23 和 D1-14 序列还与 GenBank 数据中未培养的不明确环境样品有较高的同源性。同样可稳定地检测出 *Ca.* Portiera aleyrodidarum 和 *Arsenophonus* sp. 两种螺旋粉虱内共生菌。

3　讨论

本研究以 16S rRNA 为基础，构建了螺旋粉虱体内细菌的 16S rRNA 文库和 PCR-DGGE 指纹图谱，分析了螺旋粉虱体内细菌群落多样性。PCR-RFLP 等方法构建了螺旋粉虱雌、雄成虫体内细菌的 16S rRNA 文库，共获得 10 种 OTU，雌雄成虫文库存在差异，仅 4 种 OTU 相同(表 1)；PCR-DGGE 电泳获得 12 条优势条带，同 16S rRNA 文库一样雌、雄成虫样品存在差异。推测出现此类差异的原因可能是螺旋粉虱雌、雄成虫由于生理代谢的不同而存在微生物菌群的差异，或操作处理上存在一定偏差，例如某些种属的微生物为非优势群体，在 DNA 提取过程中遗漏；有些微生物能够吸附在固体颗粒表面(Priemé *et al.*, 1996)，或包含在肠道、体壁

表 2　使用 BLAST 和 RDP classifier 与 GenBank 数据库比对最接近的细菌种类

Table 2　Most closely matched species in GenBank database with BLAST and RDP classifier

操作单元 OTU	BLAST				RDP classifier		
	GenBank 登录号 GenBank accession no.	参考菌株序列号 Most closely related hits in GenBank	菌株名 Strain	一致性(%) Identity	RDP 登录号 RDP accession no.	分类结果 Classification	一致性(%) Identity
MAB4	JQ074228	GU566350	*Pantoea* sp.	99	U006823030	*Pantoea*	100
		AY924375	*Pantoea agglomerans*	99			
		AY924374	*Pantoea agglomerans*	99			
MAC3	JQ074222	GQ250598	*Pseudomonas oryzihabitans*	99	U006823038	*Pseudomonas*	100
		HQ728562	*Pseudomonas* sp.	99			
		HQ728558	*Pseudomonas* sp.	99			
MAH11	JQ074221	FJ970034	*Exiguobacterium acetylicum*	99	U006823040	*Exiguobacterium*	100
		EU289492	Uncultured bacterium	99			
		DQ532287	Uncultured bacterium	99			
MS3F4	JQ074223	DQ532292	Uncultured bacterium	99	U006823031	*Erwinia*	97
		HQ706113	*Pantoea eucrina*	99			
		HQ455824	*P. eucrina*	98			
MS3G12	JQ074225	EU741036	*Paenibacillus hunanensis*	98	U006823041	*Paenibacillus*	100
		EU741039	*P. hunanensis*	98			
		EU741029	*P. hunanensis*	98			
MS3H11	JQ074229	DQ444289	*Citrobacter freundii*	99	U006823029	*Citrobacter*	100
		DQ068806	Uncultured bacterium	99			
		DQ294289	*Citrobacter freundii*	99			
MC4BH1	JQ074226	HQ650541	Symbiont of *Aleurodicus dispersus*	99	U006823035	*Zymobacter*	57
		AY266097	*Candidatus* Portiera aleyrodidarum	99			
		AY266096	*Ca.* Portiera aleyrodidarum	99			
FSBA8	JQ074227	GQ483459	*Rhizobium* sp.	99	U006823042	*Rhizobium*	100
		GQ483457	*Rhizobium* sp.	99			
		AY174112	*Agrobacterium* sp.	99			
MS3C11	JQ074220	EF522130	*Acinetobacter* sp.	99	U006823039	*Acinetobacter*	100
		DQ321554	Uncultured bacterium	98			
		FJ867355	*Acinetobacter baumannii*	98			
MBE3	JQ074224	FN545282	*Arsenophonus nasoniae*	99	U006823032	*Arsenophonus*	100
		AY264664	Symbiont of *Aleurodicus dispersus*	100			
		EU043378	Uncultured bacterium	99			

等组织的细胞内(Domingo *et al*., 1998)，而研磨不充分导致提取液难于深入发生作用；由于细胞结构的差异，即使采用了溶菌酶等裂解手段，某些细菌(如革兰氏阳性菌)也较难裂解(Frostegard *et al*., 1999)；在 PCR 过程中，由于模板的取样量只占总体积的很小一部分，以及 PCR 偏好(Junier *et al*., 2008)等问题均影响到扩增结果的偏差。另外，MS3F4 在 RDP classifier 和 GenBank 比对结果不一致；出现此情况的原因可能是由于两类分析均是根据未培养微生物的 16S rRNA 进行分类，而未得到纯培养菌株；16S rRNA 基因的全长为 1 500 bp 左右，即使有 99% 的一致性，也有约 15 个碱基不同；

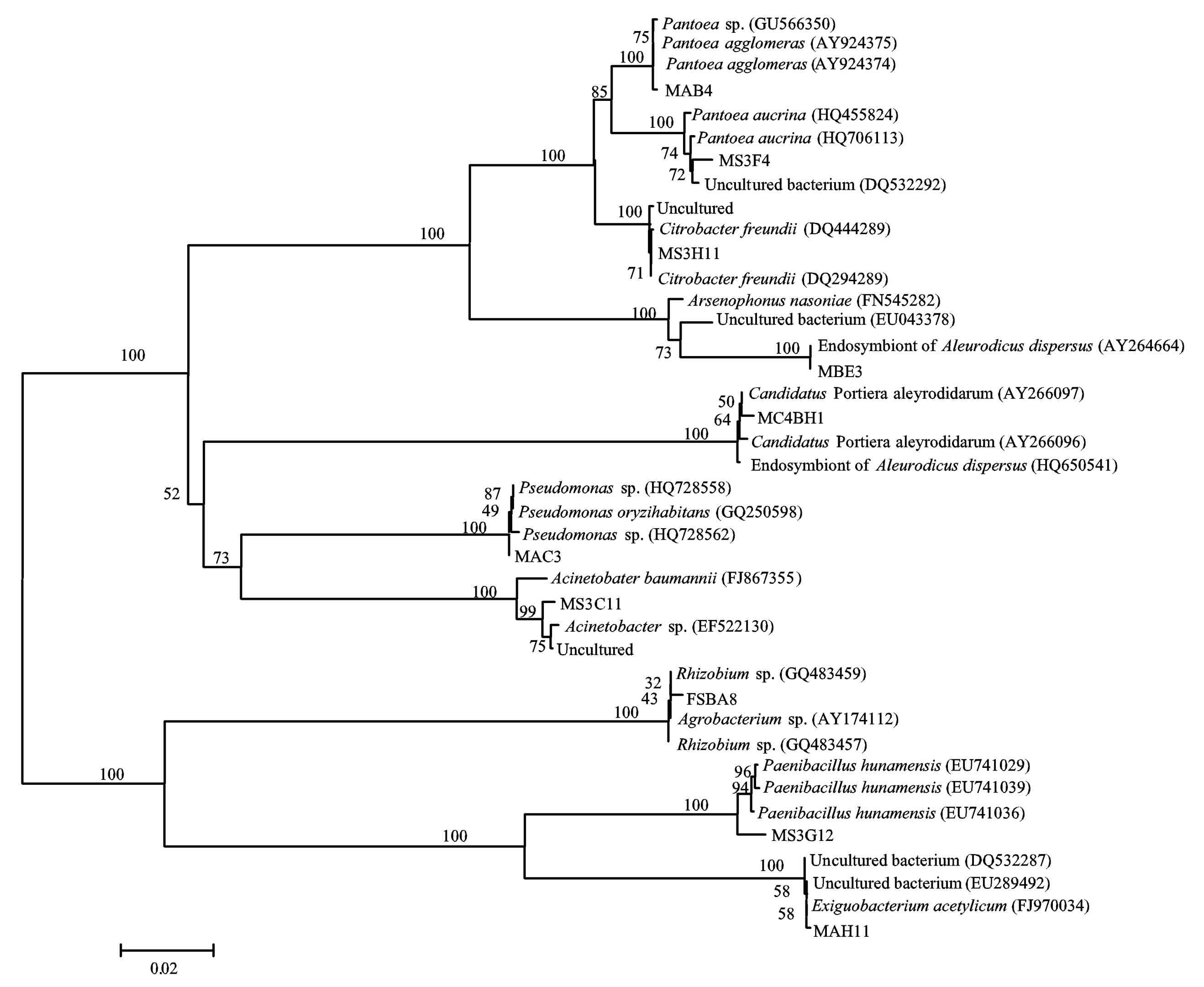


图 2　基于 16S rRNA 序列构建的螺旋粉虱体内细菌 NJ(Neighbor-Joining)系统发育进化树

Fig. 2　Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA gene sequence showing the phylogenetic position of bacteria isolated from the spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*

模型 Model: Jukes-Cantor. 分支点上的数值为支持率；标尺为进化距离。Numbers at the nodes indicate the bootstrap value for each node out of 1 000 bootstrap replications. Scale bar shows the evolutionary distance.

欧文菌属 *Erwinia* 和泛菌属 *Pantoea* 关系密切，属内种间变迁频繁(Kageyama *et al*., 1992; Hauben *et al*., 1998)，因而有可能由于分类方法和系统的不同导致 MS3F4 在分类结果上不同。获得该类共生菌的纯培养，再通过形态、生理生化等特征可更好地解决该类问题。

16S rRNA 文库和 PCR-DGGE 分析中均能检测到粉虱体内的共生细菌 *Ca*. Portiera aleyrodidarum 和 *Arsenophonus* sp. (Thao *et al*., 2004a; 2004b)。*Ca*. Portiera aleyrodidarum 目前还没有纯培养菌株被分离，所以被命名为 *Candidatus* 状态 (Murray and Schleifer, 1994; Murray and Stackebrandt, 1995; Thao *et al*., 2004a)。Baumann 等(2004)测定了烟粉虱 *Bemisia tabaci* 体内 *Ca*. Portiera aleyrodidarum 约 33 299 bp 的 DNA 片段，其 G + C 的含量为30.2%，推测该菌可能为烟粉虱体内初生共生菌，因为富含 AT 是内共生菌与寄主长期进化的基因特征。Zchori-Fein 和 Brown(2002)及阮永明和刘树生(2005)测定烟粉虱体内 *Ca*. Portiera aleyrodidarum 的 16S rRNA 基因中(A + T)%平均含量分别为52.3%和52%，而本研究中 *Ca*. Portiera aleyrodidarum 的相应基因(GenBank 登录号 JQ074226)中的(A + T)%平均含量在 52.3%，因此推测该菌株为螺旋粉虱体内初生共生菌，可能与蚜虫体内初生共生菌 *Buchnera aphidicola* 的功能相似(Douglas, 1998)，主要为宿主提供多种必需氨基酸、维生素等营养。

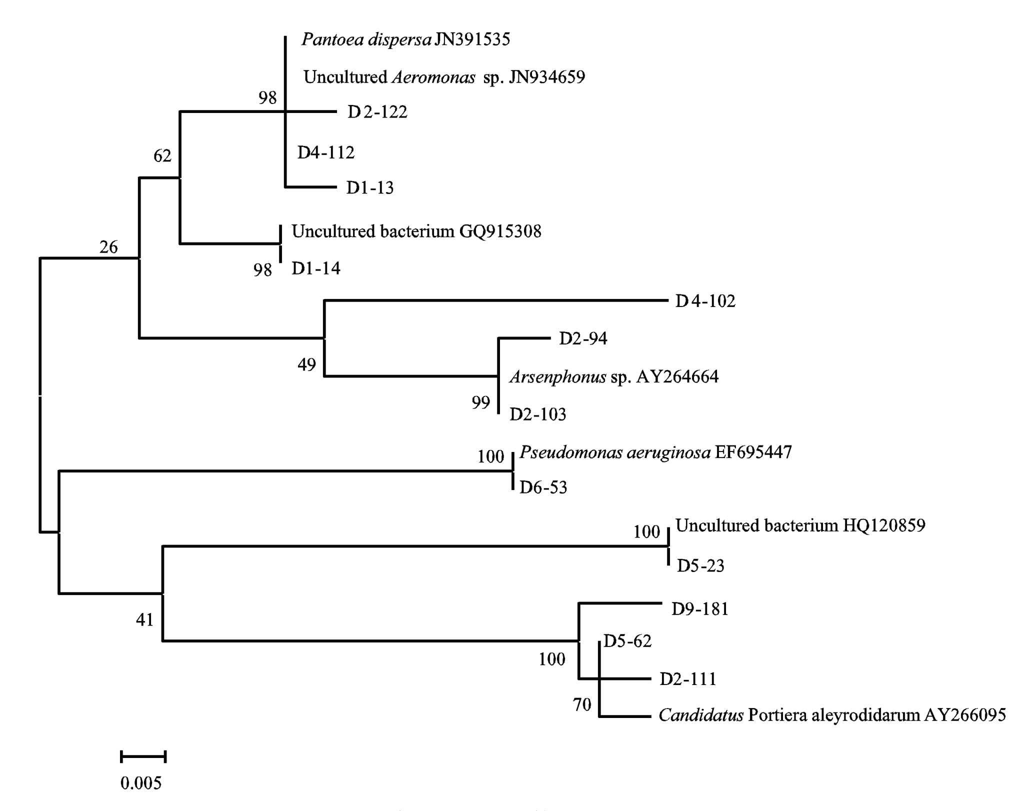


图 4　基于 16S rRNA V3 区序列构建的螺旋粉虱体内细菌 NJ(Neighbor-Joining)系统发育进化树

Fig. 4　Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA V3 sequence showing the phylogenetic position of bacteria isolated from the spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*

模型 Model：Jukes-Cantor. 分支点上的数值为支持率；标尺示进化距离。Numbers at nodes indicate the bootstrap values for each node out of 1 000 bootstrap replications. Scale bar shows the evolutionary distance.

入侵，从而参与到沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 等昆虫的免疫系统中(Bignell *et al.*, 1980；Dillon and Charnley, 1995；Vorwerk *et al.*, 2007)。*Pseudomonas* 属内的细菌已在烟粉虱(Ateyyat *et al.*, 2010)、叶蝉 *Homalodisca vitripennis* (Hail *et al.*, 2011)、缩基反颚茧蜂 *Asobara tabida* (Zouache *et al.*, 2009a)等多种昆虫体内被记录，但其与寄主昆虫的协同作用还不是十分清楚。Lee 等(1991)研究发现 *P. agglomerans* 具有冰核活性(ice nucleation active, INA)，可以将瓢虫 *Hippodamia conuerges* 的过冷却点(supercooling point)由 －16℃左右提高到 －3.1℃至 －4.4℃之间；而 Watanabe 等(1999)研究发现 *Pantoea ananas* 能提高桑螟 *Glyphodes duplicalis* 幼虫的过冷却点约 5℃。目前，螺旋粉虱只分布在热带地区，推测其体内存在的 2 种 *Pantoea* sp. (MAB4 和 MS3F4)和 1 种 *Pseudomonas* sp. (MAC3)细菌可能因具冰核活性而提高其过冷却点。

在本研究中，螺旋粉虱体内还存在其他非优细菌属(表 2 和表 4)，包括泛菌属 *Pantoea*、柠檬酸杆菌属 *Citrobacter*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、微小杆菌属 *Exiguobacterium*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、根瘤菌属 *Rhizobium*；但这些微生物是长居菌群还是过路菌群，还需要通过如荧光原位杂交等定位方法来证实(Zouache *et al.*, 2009b)。

从 16S rRNA 文库和 PCR-DGGE 指纹图谱的分析结果来看，螺旋粉虱体内的菌群多样性丰富，结构复杂。这些细菌群落是否完全参与到螺旋粉虱的代谢系统和免疫系统中，对其生长发育和生殖繁衍起到何种关键性的影响，最终的解决办法还需通过纯培养(Zucchi *et al.*, 2011)、群体基因组测序(Tyson *et al.*, 2004)和群体蛋白质学(Ram *et al.*, 2005)等方法来获得更多证据和信息，以更加深入地研究内共生关系的机制。

参 考 文 献 (References)

Ateyyat MA, Shatnawi M, Al-Mazra'Awi M, 2010. Isolation and identification of culturable forms of bacteria from the sweet potato whitefly *Bemesia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae) in Jordan. *Turk. J. Agric. For.*, 34: 225－234.

Baumann L, Thao ML, Funk CJ, Falk BW, Ng JC, Baumann P, 2004. Sequence analysis of DNA fragments from the genome of the primary endosymbiont of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Curr. Microbiol*., 48: 77 - 81.

Baumann P, 2005. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol*., 59: 155 - 189.

Bignell DE, Oskarsson H, Anderson JM, 1980. Distribution and abundance of bacteria in the gut of a soil-feeding termite *Procutiermes aburiensis* (Termitidae, Termitinae). *J. Gen. Microbiol*., 117(2): 393 - 403.

Buchner P, 1965. Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. Interscience Publishers, New York. 909 pp.

Gherna RL, Werren JH, Weisburg W, Cote R, Woese CR, Mandelco L, Brenner DJ, 1991. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int. J. Syst. Bacteriol*., 41(4): 563 - 565.

Clarridge JE, 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev*., 17(4): 840 - 862.

Darby AC, Choi JH, Wilkes T, Hughes MA, Werren JH, Hurst GD, Colbourne JK, 2010. Characteristics of the genome of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of the wasp *Nasonia*. *Insect Mol. Biol*., 19(Suppl. 1): 75 - 89.

Dillon RJ, Charnley AK, 1995. Chemical barriers to gut infection in the desert locust: *in vivo* production of antimicrobial phenols associated with the bacterium *Pantoea agglomerans*. *J. Invertebr. Pathol*., 66: 72 - 75.

Domingo JWS, Kaufman MG, Klug JW, Holben WE, Harris D, Tiedje JM, 1998. Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. *Mol. Ecol*., 7(6): 761 - 767.

Douglas AE, 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol*., 43: 17 - 37.

Frostegard A, Courtois S, Ramisse V, Clerc S, Bernillon D, Le Gall F, Jeannin P, Nesme X, Simonet P, 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol*., 65(12): 5409 - 5420.

Hail D, Lauziere I, Dowd SE, Bextine B, 2011. Culture independent survey of the microbiota of the glassy-winged sharpshooter (*Homalodisca vitripennis*) using 454 pyrosequencing. *Environ. Entomol*., 40(1): 23 - 29.

Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J, 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *System. Appl. Microbiol*., 21(3): 384 - 397.

Hertig M, Wolbach SB, 1924. Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. *J. Med. Res*., 44(3): 329 - 374.

Han DY, Liu K, Zhang FP, Huang WR, Zhang JB, Jin QA, Fu YG, 2009. Biological characteristics of the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera: Aleyrodidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 281 - 289. [韩冬银, 刘奎, 张方平, 黄武仁, 张敬宝, 金启安, 符悦冠, 2009. 螺旋粉虱的生物学特性. 昆虫学报, 52(3): 281 - 289]

Junier P, Kim OS, Hadas O, Imhoff JF, Witzel KP, 2008. Evaluation of PCR primer selectivity and phylogenetic specificity by using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol*., 74(16): 5231 - 5236.

Kageyama B, Nakae M, Yagi S, Sonoyama T, 1992. *Pantoea punctata* sp. nov., *Pantoea citrea* sp. nov., and *Pantoea terrea* sp. nov. isolated from fruit and soil samples. *Int. J. Syst. Bacteriol*., 42(2): 203 - 210.

Lambkin TA, 1999. A host list for *Aleurodicus dispersus* Russell (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. *Austr. J. Entomol*., 38(4): 373 - 376.

Lee REJr, Strong-Gunderson JM, Lee MR, Grove KS, Riga TJ, 1991. Isolation of ice nucleating active bacteria from insects. *J. Exp. Zool*., 257: 124 - 127.

Liu L, Wang ZK, Yu HW, Chen SJ, Yan GF, Xia YX, Yin YP, 2008. Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(5): 616 - 622. [刘莉, 王中康, 俞和韦, 陈仕江, 阎光凡, 夏玉先, 殷幼平, 2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报, 48(5): 616 - 622]

Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM, 1996. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol*., 62(7): 2501 - 2507.

Murray RG, Schleifer KH, 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol*., 44(1): 174 - 176.

Murray RG, Stackebrandt E, 1995. Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol*., 45(1): 186 - 187.

Priemé A, Sitaula JIB, Klemedtsson K, Bakken L, 1996. Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. *Fems Microbiol. Ecol*., 21: 59 - 68.

Ram RJ, Verberkmoes NC, Thelen MP, Tyson GW, Baker BJ, Blake RN, Shah M, Hettich RL, Banfield JF, 2005. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, 308(5730): 1915 - 1920.

Russell LM, 1965. A new species of *Aleurodicus* Douglas and two close relatives (Homoptera: Aleyrodiae). *Fla. Entomol*., 48(1): 47 - 55.

Ruan YM, Liu SS, 2005. Detection and phylogenetic analysis of prokaryotic endosymbionts in *Bemisia tabaci*. *Acta Entomologica Sinica*, 48(6): 859 - 865. [阮永明, 刘树生, 2005. 浙江 B 型与非 B 型(China-ZHJ-1)烟粉虱种群共生细菌的检测及系统发育分析. 昆虫学报, 48(6): 859 - 865]

Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H, 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407: 81 - 86.

Shen WJ, Wan FH, 2007. Analysis of potential distributive areas for *Aleurodicus dispersus* in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44

(3)：367－371.［沈文君，万方浩，2007. 入侵害虫螺旋粉虱及其在我国的适生区预测. 昆虫知识，44(3)：367－371］

Thao ML, Baumann P, 2004a. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(6)：3401－3406.

Thao ML, Baumann P, 2004b. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha：Aleyrodidae). *Curr. Microbiol.*, 48(2)：140－144.

Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF, 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428：37－43.

Vorwerk S, Martinez-Torres D, Forneck A, 2007. *Pantoea agglomerans*-associated bacteria in grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch). *Agric. Forest Entomol.*, 9：57－64.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR, 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(16)：5261－5267.

Watanabe K, Sato M, 1999. Gut colonization by an ice nucleation active bacterium, *Erwinia* (*Pantoea*) *ananas* reduces the cold hardiness of mulberry pyralid larvae. *Cryobiology*, 38(4)：281－289.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173(2)：697－703.

Wilkes TE, Darby AC, Choi JH, Colbourne JK, Werren JH, Hurst GD, 2010. The draft genome sequence of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of *Nasonia vitripennis*, reveals genes associated with virulence and symbiosis. *Insect Mol. Biol.*, 19(Suppl. 1)：59－73.

Wilkinson TL, Douglas AE, 1996. The impact of aposymbiosis on amino acid metabolism of pea aphids. *Entomol. Exp. Appl.*, 80(1)：279－282.

Woese CR, Fox GE, 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain：the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(11)：5088－5090.

Xu Y, 1999. Guarding the spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell invade China. *Plant Quarantine*, 13(4)：41－45.［徐岩，1999. 警惕螺旋粉虱传入中国. 植物检疫，13(4)：41－45］

Yen JH, Barr AR, 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*, 232：657－658.

Yu GY, Zhang GL, Peng ZQ, Liu K, Fu YG, 2007. The spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, invaded Hainan Island of China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(3)：428－431.［虞国跃，张国良，彭正强，刘奎，符悦冠，2007. 螺旋粉虱入侵我国海南. 昆虫知识，44(3)：428－431］

Yuan ZH, Lan XQ, Yang T, Xiao J, Zhou ZY, 2006. Investigation and analysis of the bacteria community in silkworm intestine. *Acta Microbiol. Sin.*, 46(2)：285－291.［袁志辉，蓝希钳，杨廷，肖杰，周泽扬，2006. 家蚕肠道细菌群体调查与分析. 微生物学报，46(2)：285－291］

Zchori-Fein E, Brown JK, 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera：Aleyrodidae). *Ann. Enotmol. Soc. Am.*, 95(6)：711－718.

Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, Karr TL, Hunter MS, 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(22)：12555－12560.

Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mavingui P, 2009a. Composition of bacterial communities associated with natural and laboratory populations of *Asobara tabida* infected with *Wolbachia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(11)：3755－3764.

Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux AB, Mavingui P, 2009b. Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*, 4(7)：e6388.

Zucchi TD, Almeida LG, Cônsoli FL, 2011. Culturable bacterial diversity associated with cysts of *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera：Margarodidae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4)：791－797.

（责任编辑：赵利辉）